

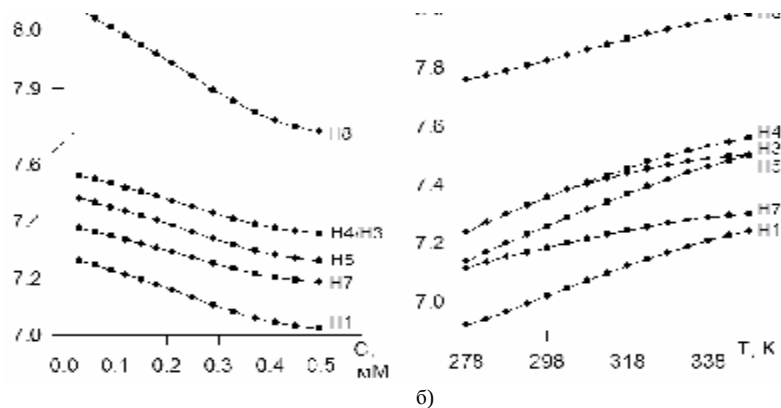
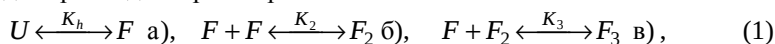


Рисунок 2 – Концентрационные (а) и температурные (б) зависимости химического сдвига протонов акридинового гомодимера

Результаты и обсуждение. Анализ концентрационных и температурных зависимостей протонных химических сдвигов AcrD (рисунок 2) свидетельствует об отсутствии явно выраженной немонотонности кривых в сравнении с исследованным ранее гомодимером этидия в близких экспериментальных условиях [8]. В работе [8] на кривых $\delta(C)$ и $\delta(T)$ наблюдался четкий минимум, отсутствующий у классических моноинтеркаляторов [9], что объяснялось конкурирующим влиянием на химический сдвиг как минимум двух реакций комплексообразования ЕВН в растворе. Проведенный в [8] вычислительный эксперимент показал наилучшее соответствие экспериментальным данным при использовании следующей модели динамического равновесия молекул гомодимера этидия в растворе:



где U и F – открытая и закрытая конформации ЕВН, соответственно (рисунок 3,а,б); F_2 и F_3 – частично интеркалированный димер и тример ЕВН, соответственно (рисунок 3,в,г). При этом образование минимума на кривых химического сдвига было обусловлено сильным деэкранированием протонов ЕВН, сближенных с зарядами линкера в комплексе F_3 (рисунок 3г), и одновременно экранированием этих же протонов в димере (рисунок 3в). Следует отметить, что азоты линкера акридинового гомодимера при использованных в работе рD (рD 7.4) не заряжены (согласно [5] константа ионизации аминогрупп линкера вблизи массивных акридиновых хромофоров понижается до значения меньше 7, что соответствует нейтральной форме линкера при рD > 7). Последнее дает основание применить модель (1) для обработки экспериментальных данных по самоассоциации AcrD (рисунок 2).

С учетом закона действующих масс, могут быть записаны уравнения для закона сохранения массы и наблюдаемого химического сдвига в условиях быстрого молекулярного обмена [8]:

$$h_0 = h_1 + K_h h_1 + 2K_2 K_h^2 h_1^2 + 3K_3 K_2 K_h^3 h_1^3$$

$$\delta = \frac{h_1}{h_0} \delta_U + \frac{K_h h_1}{h_0} \delta_F + 2 \frac{K_2 K_h^2 h_1^2}{h_0} \delta_2 + 3 \frac{K_3 K_2 K_h^3 h_1^3}{h_0} \delta_3, \quad (2)$$

где K_h и δ_U , δ_F ; K_2 и δ_2 ; K_3 и δ_3 – равновесная константа и химический сдвиг мономера, димера и тримера AcrD, соответственно; h_0 – концентрация AcrD в растворе. Как и ранее [8], химический сдвиг в открытой и закрытой формах акридинового гомодимера можно примерно полагать одинаковыми $\delta_U \approx \delta_F$. Следовательно, наблюдаемые концентрационные зависимости протонных химических сдвигов AcrD (рисунок 2,а) являются функцией шести неизвестных параметров: K_h , δ_F , K_2 , δ_2 , K_3 , δ_3 , которые могут быть найдены с использованием вычислительной процедуры, описанной ранее [8,9]. Термодинамические параметры (энтальпия и энтропия) реакций самоассоциации (1) определялись исходя из температурных зависимостей протонных химических сдвигов (рисунок 2,б) с учетом аппроксимации температурной зависимости равновесных констант K_h , K_1 , K_2 , K_3 в уравнении (2) соотношением Вант-Гоффа [8,9] и использованием аналогичной вычислительной процедуры. Величины рассчитанных параметров приведены в таблицах 1,2.

Таблица 1 – Предельные значения химических сдвигов протонов AcrD в составе различных комплексов

	H8	H4	H3	H5	H7	H1
$T = 298\text{K}$						
$\delta_U \approx \delta_F$	8.04	7.57	7.57	7.49	7.38	7.27
δ_2	7.82	7.31	7.31	7.26	7.25	7.08

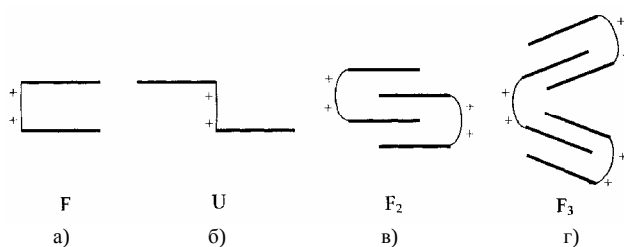


Рисунок 3 – Структуры комплексов бис-интеркалятора в водном растворе

δ_3	7.26	6.81	6.81	6.64	6.72	6.45
$T = 308\text{K}$						
$\delta_U = \delta_F$	8.05	7.58	7.57	7.51	7.38	7.28
δ_2	7.76	7.28	7.22	7.28	7.11	7.15
δ_3	7.43	6.91	6.96	6.80	6.82	6.55

Таблица 2 – Равновесные константы (л/моль), энтальпии (кДж/моль) и энтропии (Дж/моль·К) реакций самоассоциации AcrD и EBH [8]

Реакция		K_{298}	K_{308}	$-\Delta H$	$-\Delta S$
$U \leftrightarrow F$	AcrD	42 ± 10	26 ± 6	11 ± 3	6 ± 3
	EBH	25 ± 5	—	9 ± 3	4 ± 2
$F + F \leftrightarrow F_2$	AcrD	540 ± 130	400 ± 100	32 ± 5	50 ± 10
	EBH	730 ± 100	—	23 ± 3	22 ± 5
$F + F_2 \leftrightarrow F_3$	AcrD	4200 ± 1000	3200 ± 800	28 ± 5	25 ± 5
	EBH	1400 ± 200	—	26 ± 3	27 ± 5

Для подтверждения адекватности применения модели (1) к анализу данных по самоассоциации акридинового гомодимера были дополнительно проведены расчеты равновесных констант и индуцированных химических сдвигов по димерной модели, учитывающей только реакции (1а) и (1б). Среднее экранирование, полученное в такой модели на один протон AcrD, составило около 2ppm. Ранее при исследовании самоассоциации близкого по строению к AcrD моноинтеркалятора акридинового оранжевого (АО) было получено среднее экранирование внутри агрегата красителя ~1.1 ppm [9]. Из-за подобия хромофоров АО и AcrD следует ожидать близкого экранирования протонов в агрегатах этих молекул что, однако, не согласуется с расчетом по димерной модели. В то же время среднее экранирование протонов AcrD по модели (1) с учетом комплекса F_3 составляет 0.8ppm (см. таблицу 1) и находится в хорошем соответствии с индуцированными химическими сдвигами при агрегации АО. Таким образом, применение модели (1) является физически адекватным полученным в настоящей работе экспериментальным данным по самоассоциации акридинового бис-интеркалятора.

Анализ параметров агрегации AcrD (см. таблицу 2) свидетельствует о близком соответствии энергетики реакций комплексообразования молекул AcrD и EBH в растворе. Следует отметить, что линкер молекулы AcrD на 4 связи длиннее, чем линкер EBH, что позволяет предположить, во-первых, несколько большее расстояние между хромофорами в F-форме AcrD (рисунок 3,а), и во-вторых, лучший стеккинг хромофоров AcrD в комплексе F_3 (рисунок 3,г) по сравнению с образованием аналогичных комплексов EBH (длина линкера EBH в растворе является критичной для стабилизации частично интеркалированного комплекса F_3 с характерным для ароматических молекул расстоянием между хромофорами 0.34 нм [8]). По-видимому, эта является основной причиной заметного превышения константы K_3 AcrD по сравнению с EBH (см. таблицу 2) за счет более эффективных дисперсионных и гидрофобных взаимодействий при образовании 'правильного' комплекса F_3 из молекул AcrD. Высокие отрицательные значения энтальпии и энтропии реакции (1б) (см. таблицу 2) также свидетельствуют об увеличении эффективности дисперсионных взаимодействий в димере F_2 AcrD по сравнению с димером EBH.

Библиографический список

1. Waring M.J. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation / M.J. Waring // J. Mol. Biol. — 1970. — V. 54. — P. 247–279.
2. Characteristics of the interaction of anthrapyrazole anticancer agents with deoxyribonucleic acids – structural requirements for DNA-binding, intercalation, and photosensitization / J.A. Hartley, K. Reszka, E.T. Zuo et al. // Mol. Pharmac. — 1988. — V. 33. — P. 265–271.
3. Gao X. Antitumour drugs – DNA interactions – NMR-studies of echinomycin and chromomycin complexes / X. Gao, D.J. Patel // Quart. Rev. Biophys. — 1989. — V. 22. — P. 93–138.
4. DNA bifunctional intercalators. 1. Synthesis and conformational properties of an ethidium homodimer and of an acridine ethidium heterodimer / B. Gauguier, J. Barbet, R. Oberlin et al. // Biochemistry. — 1978. — V. 17. — P. 5071–5078.
5. Spectroscopic study of acridine bifunctional intercalator / J. Barbet, B.P. Roques, S. Combrisson, J.B. Le Pecq // Biochemistry. — 1976. — V. 15. — P. 2642–2647.
6. Interaction of a macrocyclic bisacridine with DNA / J.M. Veal, Y. Li, S.C. Zimmerman et al. // Biochemistry. — 1990. — V. 29. — P. 10918–10927.
7. Vitagliano V. Spectrophotometric behavior of a 'bifunctional' acridine dye / V. Vitagliano, O. Ortona, M. Parrilli // J. Phys. Chem. — 1978. — V. 82. — P. 2819–2823.
8. Исследование равновесных ассоциированных форм гомодимера этидия в водном растворе методом ^1H ЯМР спектроскопии / А.Н. Веселков, М.П. Евстигнеев, А. Эрнандес Сантьяго и др. // Физ. химия. — 2003. — Т. 77. — С. 1943–1950.
9. Davies D.B. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1996. — V. 92. — P. 383–390.

Поступила в редакцию 18.04.2005 г.